



## RAPPORT DE MISSION AU BRESIL

---

du 07/05 au 12/06/2004

D. CLEMENT  
Programme Cacao

CP-SIC N° 1754  
Octobre 2004

## AGENDA DE LA MISSION

08-05-04 : Montpellier-Paris-São Paulo- Ilhéus

10-05-04 au

10-06-04 : Activités sur le centre CEPLAC/CEPEC et contacts avec UESC

11-06-04 : Ilhéus-São Paulo-Montpellier

## TABLE DES MATIERES

I. CONTEXTE	5
II. OBJECTIF	6
III. PARTENARIAT Cirad-CEPEC	6
III.1. Présentation du CEPEC	6
III.2. Rappel de la demande du CEPEC	8
III.3. Rappel de la fonction du chercheur Cirad au CEPEC	8
III.4. Ressources du laboratoire de biologie moléculaire	8
IV. CONTEXTE DE L'ETUDE DU GENOME DU CACAOYER	9
IV.1. Outils moléculaires	9
IV.2. Méthodes	10
IV.3. Etudes de diversité et de la structuration de l'espèce	10
IV.4. Cartographie de QTL	10
V. AMELIORATION GENETIQUE ET ETUDE DU GENOME AU CEPEC	11
V.1. Programme d'amélioration génétique et de sélection	11
V.1.a. Population "non structurée"	12
V.1.b. Population "structurée sur le plan génétique"	12
V.2. Principaux travaux et résultats	13
V.2.a. Diversité et identification des sources de résistance	13
V.2.b. Etude de diversité de <i>Crinipellis pernicios</i>	13
V.2.c. Cartographie génétique et identification de QTL	13
V.2.d. Identification et sélection de génotypes résistants	14
V.3. Travaux de génomique	15
V.4. Etude histologique de la relation cacaoyer / <i>Crinipellis pernicios</i>	15
VI. ETUDES ET APPROCHES POUR UNE SELECTION ASSISTEE PAR MARQUEURS	15
VI.1. Généralités	15
VI.2. Nouvelles cartographies de QTL	16
VI.3. Exploitation du déséquilibre de liaison	17
VI.4. Identification de marqueurs liés à la résistance par B.S.A. (Bulk Segregant Analysis)	17
VI.5. Identification et cartographie de gènes	18
VII. FUTURS PROJETS	18
VII.1. Projet "Genoma Funcional de Cacau"	18

VII.2. Projet CFC/Biomol : Prolongation	19
VII.3. Nouveaux projets CFC	19
VII.4. Autres projets	20
VIII. PROGRAMME HEVEA- <i>MICROCYCLUS</i> RELATION AVEC LE CEPEC	20
VIII.1. Contexte	20
VIII.2. Demande du CEPEC	21
IX. CONCLUSION	21
X. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	23

## I. CONTEXTE

La cacaoculture dans l'état de Bahia (80% de la production de cacao du Brésil), subit depuis 1989 l'agression du pathogène *Crinipellis pernicioso*, responsable de la maladie du balai de sorcière. Lors des premières années d'infestation, d'importantes baisses de production ont eu lieu entraînant de graves conséquences économiques et sociales pour cette région. Les recherches et les actions effectuées par la CEPLAC (Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira) avec respectivement un département recherche : le CEPEC (Centro de Pesquisas do Cacau) et un autre consacré à la vulgarisation : le CENEX (Centro de Extensão), ont permis d'apporter un certain nombre de réponses aux problèmes posés par cette maladie. Des cacaoyers résistants à la maladie ont ainsi été sélectionnés au sein d'un grand nombre d'exploitations privées (Fazendas) et le CEPEC a repensé son programme d'amélioration génétique. Aujourd'hui, la CEPLAC est en mesure de diffuser des nouveaux clones et des hybrides améliorés pour la résistance à *Crinipellis pernicioso*. Il reste cependant un travail important à faire notamment sur le plan génétique pour s'assurer de la durabilité de la résistance. Pour cela, il est important de mieux connaître le niveau d'agressivité et l'évolution du pathogène, et de fixer, chez le cacaoyer, les allèles favorables à partir de diverses sources de résistance.

Pour mener à bien ces objectifs, l'apport des marqueurs moléculaires et le développement de la génomique, au sens large, apportent une aide considérable à la sélection classique. Ainsi, depuis 1998, le CEPEC s'est doté d'un laboratoire de biotechnologie qui lui permet de poursuivre des recherches dans les domaines de la biologie moléculaire et de la biologie cellulaire. Des résultats ont été obtenus à partir d'études de diversité à la fois sur le pathogène et sur la plante, et un QTL de résistance significatif a pu être identifié. Parallèlement aux travaux réalisés au CEPEC, l'UESC (Universidade Estadual de Santa Cruz) s'est également impliquée dans différents projets portant sur l'étude de la relation Cacao-*Crinipellis*. Il s'agit de thèmes relatifs aux approches génomiques dont la finalité est à la fois d'identifier les principaux gènes qui confèrent de la résistance mais aussi de comprendre comment ils agissent. Une grande partie de ces projets sont menés en partenariat avec la CEPLAC et d'autres organismes de recherche brésiliens.

Par ailleurs, il est important de préciser, que sur le plan international, plusieurs organismes de recherche publics et privés interviennent sur l'étude du génome du cacaoyer soit directement soit en finançant des projets. Nous trouvons ainsi : l'USDA/ARS et Pennstate University aux USA, l'University de Reading au Royaume Uni et le Cirad. Le Cirad entretient plusieurs partenariats avec les pays producteurs de cacao. Il finance notamment l'expatriation de chercheurs intégrés aux centres nationaux de recherche de ces pays. Le secteur privé et



industriel du Nord est également très présent à l'image de l'entreprise Masterfoods aujourd'hui très impliquée dans la recherche sur le cacao, à la fois comme co-financeur de projet mais aussi par ses propres actions de recherche conduites notamment à la Fazenda "Almirante cacao", située dans la même région que celle du CEPLAC.

## II. OBJECTIF

Depuis 2001, date des premières missions du programme cacao avec un appui financier du MAE, le Cirad poursuit une politique de collaboration avec le Brésil à travers une recherche d'excellence focalisée sur la lutte génétique contre la maladie du balai de sorcière. Ainsi, depuis octobre 2002, Fabienne Micheli (génomiste au Cirad) est en poste à UESC et contribue à l'obtention de banques d'ESTs (Expressed Sequence Tag) et à la caractérisation de gènes de résistance à *Crinipellis pernicioso*.

En décembre 2003, grâce au même type de financement, une mission réalisée par Didier Clément, avec l'appui de P. Petithuguenin chef du programme cacao, a permis d'entériner le projet de partenariat entre le Cirad et la CEPLAC/CEPEC. L'affectation au CEPEC de Didier CLEMENT en tant que chercheur en génétique moléculaire est prévue en octobre 2004. Le projet scientifique, qui scelle cette coopération, porte sur l'amélioration génétique du cacaoyer à l'aide de marqueurs moléculaires et leur utilisation en sélection afin de créer un nouveau "germplasm" résistant à la maladie du balai de sorcière.

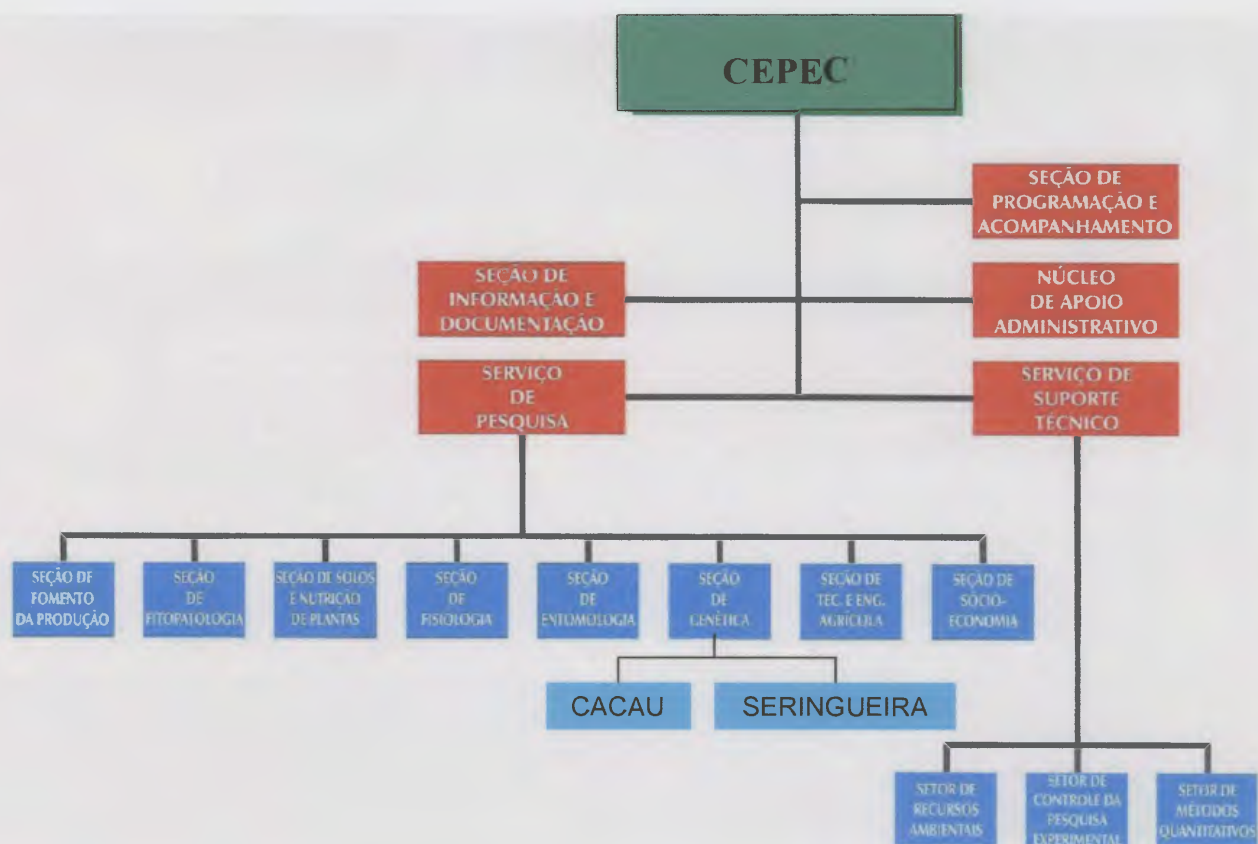
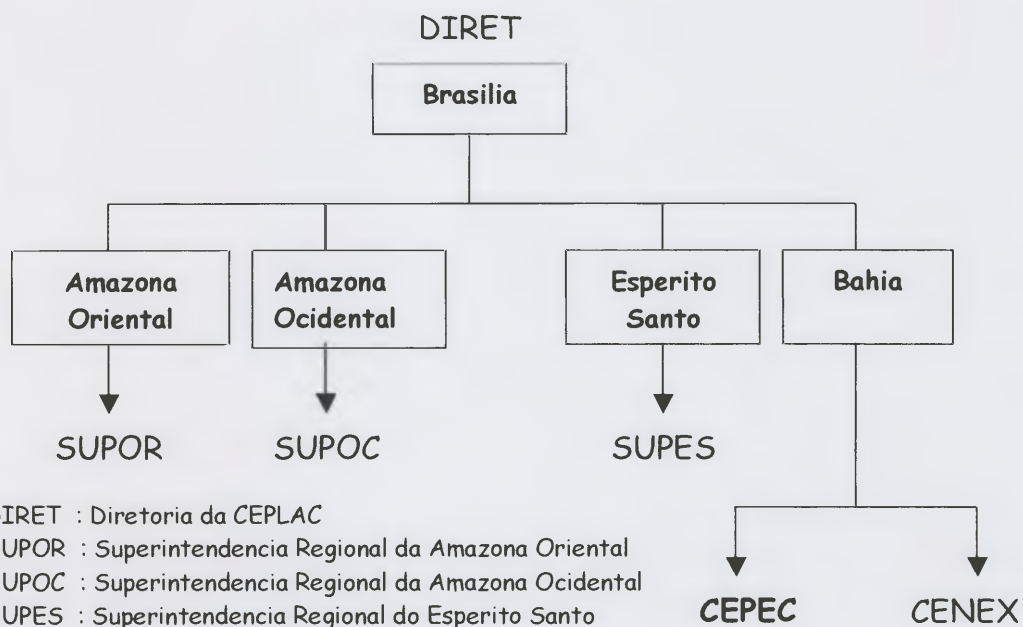
L'objectif de cette mission, effectuée environ 6 mois avant l'affectation du chercheur au CEPEC, était d'aborder plus précisément les aspects opérationnels de cette collaboration à travers les projets en cours et ceux à mettre en place. Il s'agissait aussi de préparer la future affectation de l'agent.

## III. PARTENARIAT Cirad-CEPEC

### III.1. Présentation du CEPEC

Une présentation de la CEPLAC/CEPEC est disponible sur le site web : [http : //www.cepec.gov.br](http://www.cepec.gov.br). Elle figure également dans le précédent rapport de mission (Cirad N° 1680). Pour plus de clarté, l'organisation de cette institution est de nouveau présentée.

## Organigrama de la CEPLAC



Le directeur du CEPEC est Uilson Lopes Vanderlei. Il est assisté par deux principaux adjoints : José Luis Pires, responsable de la programmation scientifique et Luis Pereira, responsable de la gestion administrative et financière.

### III 2. Rappel de la demande du CEPEC

Depuis quelques années, le CEPEC semble s'ouvrir à d'autres institutions de recherches. En effet, le projet CFC/Biomol, financé principalement par le CFC et le gouvernement brésilien et sur lequel nous reviendrons plus loin, fait intervenir deux autres pays sud-américains producteurs de cacao : l'Equateur et le Pérou. De même, la participation du CEPEC au premier et second projet CFC/ICCO/IPGRI en est une bonne illustration.

La demande de partenariat formulée par le CEPEC auprès du Cirad a été motivée par un besoin d'appui dans le domaine de l'amélioration génétique à l'aide des marqueurs moléculaires. L'équipe du Cirad a en effet acquis une reconnaissance internationale sur l'étude du génome du cacaoyer, validée par de nombreuses publications, ce qui lui permet aujourd'hui de répondre favorablement à cette demande.

### III 3. Rappel la fonction du chercheur Cirad au CEPEC

Le chercheur Cirad sera appelé à assurer la conduite et l'animation des opérations de recherche liées au projet scientifique précédemment mentionné. Il prendra part également aux activités de sélection, notamment pour la mise en place de nouveaux schémas de sélection assistée par les marqueurs moléculaires. Il est également prévu qu'il puisse assurer un rôle de co-encadrant scientifique (Universités brésiliennes) pour le suivi d'étudiants en "mestrado" (DEA). Enfin, il conduira bien évidemment son activité en étroite collaboration avec Fabienne Micheli dont une partie de l'activité est déjà liée à celle du CEPEC et avec les autres chercheurs du Cirad concernés.

### III. 4. Ressources du laboratoire de biologie moléculaire

Les ressources du laboratoire de biologie moléculaire du CEPEC ont été présentées dans le précédent rapport de mission (Cirad N° 1680). Cependant, concernant les équipements, il est important de noter que l'acquisition d'un nouveau séquenceur (16 capillaires) devrait optimiser les analyses de fragments d'ADN et, par conséquent, la construction de cartes génétiques réalisée jusqu'à présent avec un seul séquenceur (migration sur acrylamide/Prism ABI 377)



Par ailleurs, l'équipe "Cytogenetica e Marcadores Moleculares" de UESC, dirigée par Fernanda Gaitto dispose également d'un séquenceur (ABI 377). De fréquents échanges ont eu lieu entre ce laboratoire et celui du CEPEC et j'ai rencontré Fernanda Gaitto à ce sujet. Elle m'a fait part de son souhait de renforcer cette collaboration pour l'instant matérialisée par un appui mutuel en terme d'équipements et de produits moléculaires.

#### IV. CONTEXTE DE L'ETUDE DU GENOME DU CACAOYER

Avant d'aborder la partie consacrée aux travaux sur le génome de cacaoyer réalisés par le CEPEC, un bref rappel des connaissances acquises dans ce domaine permettra de mieux percevoir son positionnement.

##### IV.1. Outils moléculaires

Les études de diversité et de cartographie ont fait appel à :

- des marqueurs moléculaires non spécifiques (RAPD et AFLP), qui sont facilement disponibles
- des marqueurs moléculaires spécifiques du génome du cacaoyer, qui sont eux issus de travaux de recherche réalisés par diverses équipes dont celle du Cirad.

Les principaux marqueurs et outils moléculaires spécifiques du cacaoyer sont les suivants :

- Des RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism), il s'agit de sondes génomiques et cDNA. Les premières banques de sondes génomiques et cDNA ont été construites il y a environ une dizaine d'années lors des premières études de diversité et de cartographies. Ainsi, 178 marqueurs RFLPs ont été cartographiés et certaines de ces sondes nous permettent aussi aujourd'hui d'identifier les allèles apportés par une origine de cacaoyer comme par exemple ceux qui caractérisent les Criollo anciens.
- Des SSR (Single Sequence Repeated) ou marqueurs microsatellites. Les microsatellites sont aujourd'hui les marqueurs les mieux appropriés pour construire des cartes génétiques. Ils nécessitent en effet, de très petites quantités d'ADN. Ils possèdent un haut niveau de polymorphisme. Enfin, ils sont d'un usage relativement facile (PCR, gel acrylamides, gel agarose et révélation par fluorescence, marquage radioactif ou nitrate d'argent). Aujourd'hui, 269 microsatellites sont cartographiés et disponibles (Pugh et al., 2004).
- Des banques de fragments d'ADN ou banque BAC (Bacterial Artificial Chromosome). Deux banques de fragments d'ADN d'environ 120 kb chacune ont récemment été construites. L'une a été réalisée par le Cirad à partir du génotype

Scavina-6, résistant à *Phytophthora* spp et *Crinipellis perniciosa* (Clément et al. 2004). Les clones BACs de cette banque et des jeux de filtres macro-arrays sont disponibles. La seconde banque BAC a été construite à Clemson University pour le compte de l'USDA/ARS. Le génotype LCT-EET 36, résistant à la Moniliose (*Moniliophthora roreri*), a été utilisé.

- Des homologues de gènes de résistance (RGA) et de défense (DGA) ont été caractérisés (Kuhnd et al., 2003; Lanaud et al., 2004) et certains de ces gènes ont été cartographiés. Des RGA, cartographiés dans des régions de génome associées à la résistance à *Phytophthora*, ont pu être reliés à des clusters de clones BAC (Clément et al., 2004).

Par ailleurs, des marqueurs spécifiques du génome de deux pathogènes : *Crinipellis perniciosa* et *Phytophthora* spp, ont été respectivement obtenus par plusieurs partenaires brésiliens dont le CEPLAC et UESC, associés dans un projet sur le séquençage de *Crinipellis perniciosa* et par le Cirad.

#### IV.2. Méthodes

Les méthodes d'extraction d'ADN ont été améliorées et celles concernant l'extraction de l'ARN total (UESC) ont fait l'objet de travaux publiés.

Les méthodes d'analyses de diversité et de détection de QTL se sont affinées.

#### IV.3. Etudes de diversité et de la structuration de l'espèce

De nombreuses études de diversité ont été faites à partir des différents "germplasms" implantés dans les centres nationaux de recherche sur le cacaoyer. Les principaux résultats publiés donnent aujourd'hui une image plus précise de la structuration de l'espèce. Parmi ces nombreuses études, une étude relativement récente effectuée par Motamayor et al. 2003, apporte des informations nouvelles sur la structure de la population Criollo et Trinitario et sur le processus de fondation de ces groupes. Une étude brésilienne a également permis de mieux caractériser l'importante collection de cacaoyers originaire d'Amazonie<sup>1</sup>.

#### IV.4. Cartographie de QTL

Plusieurs populations ont été, à ce jour, cartographiées afin de détecter des QTL. Les descendances analysées provenaient de croisements entre deux parents hétérozygotes, de croisements entre un parent hétérozygote et un autre fortement homozygote (pseudo test-cross) et de F2. Une douzaine de cartes génétiques ont ainsi été construites. Parmi ces cartes génétiques, celle

(1) Thèse de Jay Wallace soutenue en 2003



issue de la descendance UPA402 par UF676 a été la première à être publiée, elle est considérée aujourd'hui comme la carte génétique de référence du cacaoyer. Cette carte comporte 465 marqueurs spécifiques (codominants) répartis et ordonnés en 10 groupes de liaisons (Pugh et al., 2004).

Les principaux QTL ont été identifiés à partir de données phénotypiques obtenues dans les programmes de sélection (Crouzillat et al., 2000, Flament et al., 2001, Queiroz et al., 2003, Clément et al., 2003a et 2003b). Des QTLs pour la résistance aux maladies (*Phytophthora* spp et *Crinipellis*) ainsi que des QTL d'autres caractères agronomiques et de qualité, ont ainsi été identifiés. Ces QTL sont associés à des gènes (allèles) dont l'expression (la variation phénotypique) a été mesurée dans les conditions du champ. A l'inverse, certains QTL ont été identifiés en conditions contrôlées (laboratoire, serres) comme ceux mis en évidence pour la résistance à *Phytophthora* à partir de tests d'inoculations sur feuilles (Risterucci et al., 2003).

## V. AMELIORATION GENETIQUE ET ETUDE DU GENOME DU CACAOYER AU CEPEC

### V. 1. Programme d'amélioration génétique et de sélection au CEPEC.

Le programme d'amélioration génétique et le schéma de sélection ont été redéfinis à partir de 1989, date de l'introduction de la maladie du balai de sorcière dans cette région de cacao du Brésil. Le verger était alors constitué d'environ :

- 60% de variétés "commun"
- 40% de variétés hybrides

Le programme d'amélioration génétique du CEPEC s'est alors orienté vers la recherche de nouvelles ressources génétiques pour la résistance au balai de sorcière (nouveaux allèles favorables). Des travaux sur l'évaluation de génotypes résistants ont été effectués à partir des collections du CEPEC mais aussi à partir de cacaoyers résistants à la maladie et repérés dans de nombreuses fazendas.

Après confirmation du comportement de ces génotypes résistants, un programme de substitution du matériel sensible par de nouveaux hybrides et des clones a été progressivement mis en place. Cependant, les clones résistants sélectionnés étant parfois auto-incompatibles, des dispositifs de plantations ont été proposés aux agriculteurs lors de la distribution de ce nouveau matériel végétal.

Le programme d'amélioration du CEPEC distingue deux types de populations : l'une dite : "non structurée", la seconde dite : "structurée sur le plan génétique".

#### V.1.a. Population "non structurée"

Cette population est constituée par des hybrides classiques (descendances de plein-frères), les collections du CEPEC et celles des autres stations de la CEPLAC comme l'importante collection issue des prospections en Amazonie brésilienne et installée au CEPLAC/Belem. A partir d'individus repérés dans les populations d'hybrides, différents types de croisements ont été réalisés : des hybrides de type F1, de type F2, des hybrides doubles et triples, et des auto-fécondations. Une première étape a permis de créer 186 descendances, ce qui représente 9670 arbres observés individuellement sur les principaux critères de sélection (maladie, production, vigueur, caractères des fèves). Par la suite, des individus ont de nouveau été sélectionnés comme géniteurs mâles ou/et femelles, ceci, afin de créer de nouvelles combinaisons. Cette seconde étape a produit 112 nouvelles descendances hybrides soit l'équivalent de 8000 arbres également observés individuellement. Au total, ces deux programmes de sélection ont donc permis de créer un nouveau "germplasm" de 17.760 arbres issus de 258 croisements. Il est à noter que le génotype Scavina-6, connu pour sa résistance à *Crinipellis* mais aussi résistant aux maladies à *Phytophthora*, intervient très souvent comme géniteur mâle ou femelle dans ces croisements.

#### V.1.b. Population "structurée sur le plan génétique" :

Il s'agit essentiellement des essais implantés suivant un dispositif factoriel permettant d'évaluer des paramètres génétiques. Un tel dispositif a ainsi été mis en place dans le cadre d'une stratégie de sélection récurrente. L'objectif de ce programme qui va entrer prochainement dans un second cycle, est de cumuler des allèles favorables pour les principaux caractères agronomiques mais surtout de cumuler ceux qui confèrent de la résistance aux maladies : *Crinipellis*, *Phytophthora* et *Ceratocystis* (tracheomycose ou mal de machette). Le choix des géniteurs intervenant dans ce dispositif a été établi à partir des études portant sur l'évaluation des distances génétiques, calculées à l'aide de données phénotypiques et moléculaires (RAPD, SRR).

Le dispositif est constitué par un plan factoriel 8 x 8 comportant, 8 géniteurs Forastero Haut-amazoniens (A) et 8 géniteurs Forastero Bas-amazoniens (B). Il y a donc 64 croisements répartis de la façon suivante :

16 croisements de type AA

16 croisements de type BB

32 croisements de type (AB/BA)



## V. 2. Les principaux travaux et résultats

### V. 2.a. Diversité et identification des sources de résistance

Les travaux réalisés tant sur les accessions de la collection du CEPEC que sur les descendance et dispositifs précédemment présentés ont permis de mettre en évidence la dispersion de génotypes résistants à *Crinipellis pernicioso* (analyses des distances génétiques entre les clones résistants). Ces résultats montrent en fait qu'il est possible de diversifier les sources de résistance. Les résultats obtenus par ailleurs à partir du dispositif factoriel ont permis d'évaluer certains paramètres génétiques comme l'AGC (Aptitude Générale à la Combinaison). Une synthèse de ces résultats est présentée dans la thèse de Jose Luis Pires (2003).

### V. 2.b. Etude de diversité de *Crinipellis pernicioso*

Une banque de 600 isolats collectés dans 12 agro-systèmes de la zone cacaoyère de Bahia a été réalisée et des mesures d'agressivité du pathogène ont également été effectuées. Les résultats obtenus ont permis d'avoir une meilleure estimation de la diversité du pathogène et de son comportement au sein des différents agro-systèmes pris en compte dans cette étude. Ces études ont été faites dans le cadre du projet CFC/Biomol.

### V. 2.c. Cartographie génétique et identification de QTL

Les chercheurs du CEPEC associés à d'autres chercheurs brésiliens (Université de Viçosa) ont identifié, à l'aide d'une population F2 dérivée du croisement entre Scavina-6 (résistante à *Crinipellis*) et ICS-1 (sensible), un QTL associé à la résistance à la maladie du balai de sorcière (Quiroz et al., 2003). La carte génétique a été construite à l'aide de marqueurs RAPD et, par la suite, complétée avec des microsatellites. Ces derniers marqueurs ont permis, entre autre, de définir la région où se trouve ce QTL. Il s'agit du groupe de liaison 7 de la carte de référence. Les données phénotypiques obtenues au champ concernaient surtout des comptages de balais végétatifs et de balais de coussinets floraux. La variation phénotypique expliquée par ce QTL (35%) atteste d'un gène ou d'un cluster de gènes majeurs.

Différentes études de détections de QTL sont en cours. Ces études sont, pour la plupart, supportées financièrement par le projet CFC/Biomol précédemment mentionné. Les travaux sont conduits dans le cadre de thèses ou de mestrados par des chercheurs du CEPLAC ou des étudiants. On peut citer :

- le travail de thèse de Paulo Albuquerque chercheur au CEPLAC-PA. Cette thèse porte sur la détection de QTL associés à la résistance à la maladie du balai de

sorcière à partir de tests d'inoculations de méristème. Les plants inoculés sont issus de croisements entre clones sensibles (ICS 39 et PA 195) et clones résistants (CAB 214, CAB 270, CAB 208 et RB 36). Les effectifs pour chacun des croisements analysés sont les suivants :

- 144 plants pour ICS 39 x CAB 214
- 144 plants pour ICS 39 x CAB 270
- 144 plants pour ISC 39 x RB 36
- 76 plants pour ICS 39 x CAB208
- 147 plants pour PA 195 x CAB 270
- 68 plants pour PA 195 x CAB 214

Une partie de ces croisements (PA 195 x CAB 270, ISC 39 x CAB 214 et ISC 39 x RB 36) a été plantée sur une parcelle de la station de CEPLAC-PA. Les données phénotypiques sur la résistance à la maladie au champ permettront de voir si l'on peut confirmer le QTL déjà identifié, en identifier de nouveaux et voir si l'on met en évidence des co-localisations avec ceux identifiés à partir des données phénotypiques obtenues lors des inoculations.

- Une étude réalisée par Alfredo Dantas Neto du CEPEC (mestrado) sur la cartographie de QTL, à partir d'une très ancienne plantation constituée par une population issue du croisement entre SIC-864 par CCN51. La population analysée comporte environ 200 individus. Les données phénotypiques ont été obtenues à partir des sept dernières années d'observations.

- Dario Anher, de l'Université UESC était précédemment généticien au CEPEC. En collaboration avec Almirante cacao (Masterfoods) et le CEPEC, il anime, aujourd'hui un projet de cartographie de QTL de résistance au balai de sorcière et de QTL associés aux autres caractères agronomiques à partir du croisement entre CCN51 x TSH1188. Le génotypage de 300 individus est en cours. Cette étude présente un grand intérêt, compte tenu à la fois du croisement utilisé et de l'effectif de la population, qui donne une bonne puissance de détection de QTL.

#### V. 2.d. Identification et sélection de génotypes résistants

Ronaldo Cavalho Santos du CEPEC (mestrado) effectue une étude dont l'objectif est de repérer des génotypes résistants à la maladie du balai de sorcière à partir des résultats obtenus sur la population F2 (Scavina-6 x ICS1), où le QTL majeur de résistance au balai de sorcière a été identifié. Pour cette étude, deux populations ont été constituées. La première population est dérivée d'une trentaine de plantes résistantes et de 10 plantes sensibles issues d'une génération F2 de Scavina-6 x ICS1 (clone TSH-516). Pour chacun de ces

individus sélectionnés, 50 plantes ont été obtenues en pollinisation libre. Cette première population est donc constituée d'environ 2000 plants.

Une seconde population a été établie à partir de 10 clones issus de 20 descendances du clone TSA644 (clones maintenus dans la collection). A partir de chacun de ces 200 individus, 50 boutures ont été faites. Cette seconde population est donc constituée par environ 1000 boutures.

Tous les individus de ces deux populations ont été inoculés par *Crinipellis* suivant le protocole en vigueur au CEPEC et ont été évalués (60 jours après le retour en pépinière) sur bases de présence (1) ou absence (0) des symptômes spécifiques à la maladie. La sélection sur marqueurs est faite à partir des différents marqueurs associés au QTL. Une approche combinée de sélection phénotype + marqueurs est également prévue selon un modèle analogue à celui proposée par Lande & Thompson (1990).

### V.3. Travaux de génomique au CEPEC.

Karina Gramacho, phytopathologiste du CEPEC, anime un projet sur l'identification et la caractérisation d'EST en mode d'expression différentiel dans le processus d'infection et non-infection de la cabosse par *Crinipellis perniciosa*. L'étude est effectuée par Humberto Zaidan grâce à un financement FAPES-B (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia). Par ailleurs, les relations dans ce domaine entre UESC et CEPEC se sont bien améliorées et Fabienne Micheli (Cirad/UESC) et Abelmon Gestria (UESC/FAPES-B) travaillent en étroite collaboration avec l'équipe du CEPEC.

### V.4. Etude histologique de la relation cacaoyer/ *Crinipellis perniciosa*

Karina Gramacho a entrepris, en collaboration avec Fabienne Micheli et Laurence Alemanno (Cirad-Montpellier), une analyse histologique de la pénétration du champignon à différents stades d'infection de la plante. Les résultats (en cours) pourraient mettre en évidence des réponses différentes entre génotypes résistants et sensibles par rapport au processus de pénétration du champignon.

## VI. ETUDES ET APPROCHES POUR UNE SELECTION ASSISTEE PAR MARQUEURS.

### VI.1. Généralités

La sélection assistée par marqueur peut faire appel à deux types de marqueurs :

- des marqueurs "directs " et, dans ce cas idéal, le marqueur est un gène



- des marqueurs "indirects" et, dans ce cas, il s'agira de marqueurs en déséquilibre de liaison avec les gènes. Par conséquent dans cette situation, se pose le problème du maintien de la liaison entre le marqueur et le ou les gènes. Autrement dit, toute fragilité de cette liaison est susceptible de remettre en cause la sélection faite avec le ou les marqueurs supposés associés aux gènes d'intérêt.

Trois types d'informations peuvent être disponibles :

- Des informations sur des gènes connus, informations par exemple figurant dans les bases de données et générées par les nombreuses études sur différents couples plante-pathogène. Nous pouvons trouver ainsi de nombreux gènes codant pour des protéines intervenant dans les processus d'infection de la plante par le pathogène.
- Des informations relatives aux QTLs. Chez le cacaoyer, nous avons à faire à des maladies généralement polygéniques (*Phytophthora*) et la détection d'un QTL de résistance est, dans ce cas, la résultante de l'expression des allèles de ces gènes. Au sein d'une population en ségrégation, on met alors en évidence la variation phénotypique des caractères retenus (symptômes de la maladie au champ ou en milieu contrôlé). La détection de régions chromosomiques liées à l'expression de ces gènes nécessite des dispositifs appropriés qui, dans le cas, du cacaoyer n'étaient pas toujours disponibles, notamment ceux qui auraient permis de valider des QTL dans divers environnements.
- Enfin, des informations relatives aux QTLs non détectés. Il s'agit en fait d'informations auxquelles on a accès uniquement via le phénotype. Dans ce cas, la question qui se pose sera de déterminer, dans le schéma de sélection, les parts d'informations respectivement apportées par le phénotype et les marqueurs.

## VI.2. Nouvelles cartographie de QTL

La cartographie génétique et la détection de QTL à partir de la descendance CCN51 x TSH1188, sont actuellement réalisées hors du CEPEC (Almirante cacau et coordination par Dario Ahnert). Dans le cadre du nouveau projet CFC/ ICCO/ IPGRI qui devrait être prochainement signé par le Brésil, il est prévu de dupliquer cette descendance dans deux autres environnements. Il s'agirait d'implanter cette population au CEPEC et au Costa Rica où se retrouvent à la fois *Crinipellis pernicioso* et *Moniliophthora rorei* (menace future pour le Brésil). L'objectif est de valider et détecter des QTL en tenant compte des effets environnementaux. Une concertation entre le CEPEC, Almirante cacau et UESC devrait pouvoir préciser pour la suite, les travaux à réaliser par chacune des équipes.



A partir du dispositif factoriel du CEPEC mentionné précédemment, il pourrait être envisagé de faire une étude de détection de QTL à partir d'une carte multi-parentale. L'effectif par descendance se situe autour de 60 à 80 plants (5 répétitions de 16 plants). Cette approche a été utilisée par N. Billotte (programme palmier du Cirad) afin de détecter des QTL de résistance à la fusariose (soutenance de thèse fin 2004). Un logiciel, conçu par l'INRA et adapté à la construction de carte multi-parentale, a été utilisé.

Enfin, pour les projets de cartographie de QTL en cours et précédemment mentionnés, il pourrait être envisagé de mieux préciser (ajout de nouveaux marqueurs microsatellites) les régions du génome impliquées dans l'expression de la résistance à *Crinipellis* et celles de la résistance aux autres maladies.

### VI.3. Exploitation du déséquilibre de liaison

Le maintien de la liaison génétique entre gènes et marqueurs et l'exploitation de la force de cette liaison en sélection est une approche qui pourrait s'avérer particulièrement intéressante chez le cacaoyer. En effet, une étude sur le maintien du déséquilibre de liaison au sein des populations Criollo et Trinitario est en cours (deux thèses dont les soutenances sont prévues fin 2004). Les résultats obtenus sont donc très attendus. Le CEPEC dispose de nombreuses descendance faisant intervenir le génotype Scavina-6. Une réflexion pourrait être conduite dans ce sens afin de voir s'il est envisageable d'exploiter cette approche.

### VI.4. Identification de marqueurs de résistance par la méthode BSA (Bulk Segregant Analysis)

Cette approche suppose en théorie l'implication de gènes majeurs de résistance à la maladie du balai de sorcière. En effet, pour un marqueur donné, la distinction entre individus résistants et individus sensibles se fait par la présence ou l'absence d'allèles dans l'ADN en mélange d'un groupe d'individus résistants (10 individus environ) et d'un groupe d'individus sensibles. Les résultats obtenus jusqu'à présent semblent montrer que très peu de gènes interviendraient dans la résistance à *Crinipellis perniciosus*. Cette méthode, qui est plus ou moins abordée dans le projet de Ronaldo Santos (voir plus haut), pourrait être optimisée si l'on pouvait confirmer, par d'autres analyses de détection de QTL, le caractère " monogénique " de la résistance au balai de sorcière.

## VI.5. Identification et cartographie de gènes.

L'équipe de "Genômica e Expressão Gênica", rattachée au département de "Ciências Biológicas" de UESC, accueille Fabienne Micheli. L'équipe est constituée d'enseignants chercheurs qui travaillent en étroite collaboration avec deux autres équipes : une en "bio-informatica" et la seconde en "Cytogenetica e Marcadores Moleculares". L'étude en génomique fonctionnelle de l'interaction cacaoyer-*Crinipellis pernicioso* a permis de développer un nouveau protocole d'extraction d'ARN total, de construire deux banques d'ADNc, et de faire le séquençage des ESTs correspondantes. Ces travaux se poursuivent avec parfois des difficultés inhérentes au fonctionnement du laboratoire (commande de produits). Une centaine de gènes candidats sont déjà identifiés mais non encore caractérisés. Ces gènes pourraient être cartographiés (PCR et restriction) et certains utilisés comme marqueurs pour la sélection.

## VII. FUTURS PROJETS

### VII.1. Projet "Genoma Funcional de Cacau "

Un nouveau projet intitulé "Genoma Funcional de Cacau" doit être présenté à FAPES-B en septembre 2004. Il s'agit en fait d'un projet commun CEPEC-UESC qui prend en compte les résultats obtenus par le CEPEC (J.L. Pires et K. Gramacho) sur la divergence génétique entre génotypes en relation avec la résistance à la maladie du balai de sorcière. L'objectif de ce projet est d'identifier des gènes impliqués dans le processus de résistance à *Crinipellis* à partir d'autres sources de résistance que celle associée à Scavina-6. Par la suite, une approche par "pyramiding" permettrait de fixer les allèles favorable et, *in fine*, donner au matériel végétal sélectionné, une résistance durable à la maladie du balai de sorcière. Le projet fait intervenir conjointement des aspects génomiques et de la cartographie génétique. La partie génomique serait traitée à UESC (l'obtention de RNA total, la réalisation des banques de cDNA, l'isolement et le séquençage des gènes). La cartographie génétique des descendances issues de croisements entre les génotypes (clones) retenus dans le projet serait, quant à elle, réalisée au CEPEC.

## VII.2. Projet CFC/Biomol : prolongation

Financé par le CFC et le gouvernement brésilien, le projet CFC/Biomol a permis au CEPEC de réaliser plusieurs études sur le cacaoyer et *Crinipellis pernicioso*. L'INIAP d'Equateur et l'ICT du Pérou sont associés à ce projet. Pour ces deux pays, des activités de recherche mais aussi de formation ont été faites tant sur les pathogènes (*Crinipellis* et *Moniliose*) que sur le cacaoyer. Le projet s'est déroulé sur 5 années et doit être théoriquement clôturé fin 2004. Une demande de prolongation d'un an a été faite auprès du CFC. Cette prolongation n'est pas acquise et le CFC devrait se prononcer sur ce point début 2005, sur la base des résultats obtenus et de la justification de la demande de prolongation.

## VII.3. Nouveaux projets CFC

Un nouveau projet CFC, intitulé "Increasing the durability of disease resistance by pyramiding genes through molecular tools" a été présenté à Jan Vingerhoets, Acting Executive Director de l'ICCO (International Cocoa Organization) lors d'une visite de trois jours au CEPLAC en mai 2004. Ayant moi-même assisté à la réunion de présentation des projets, il est apparu clairement que le projet CFC présenté par U. Lopes Vanderlei ne suscitait pas, dans l'immédiat, l'approbation de l'ICCO et ce, malgré son intérêt. Plusieurs raisons à cela :

Deux mois avant la visite de J Vingerhoets, J.M Anga, également de l'ICCO, avait déjà fait savoir qu'il n'était pas favorable à ce projet (encore un peu trop biomol) et que, surtout, il le trouvait, en partie, similaire à celui qui venait d'être accepté et qui sera animé par A. Eskes, projet intitulé : "Cocoa Productivity and Quality Improvement, a Participatory approach". U. Lopes Vanderlei avait alors remanié sa présentation en tenant compte de cette remarque. Cependant, pour J. Vingerhoets, le principal objectif du projet étant la création d'un nouveau "germplasm" cacao résistant aux maladies, il lui apparaît nécessaire maintenant que le CEPEC présente un projet plus ouvert, notamment en prenant en compte les autres maladies, sévissant dans d'autres zones de production que l'Amérique latine. En d'autres termes, il serait plutôt favorable à ce que le projet fasse apparaître un partenaire africain (Côte d'Ivoire, Cameroun,...), voire du Sud-Est asiatique. Cette remarque porte, bien entendu, le projet dans une autre dimension, ce qui nécessite une plus longue préparation. Il y aura donc très probablement un travail à faire pour revoir ce projet suivant les recommandations faites par l'ICCO. Nos relations avec nos partenaires traditionnels en Afrique (Cameroun, Côte d'Ivoire,...) et en Amérique du Sud (Equateur, Brésil), permettrait au Cirad d'œuvrer au rapprochement des relations scientifiques et d'intérêts communs entre ces pays.



Concernant le projet Eskes CFC/ICCO/IPGRI : "Cocoa Productivity and Quality Improvement, a Participatory approach", il est envisagé que le chercheur Cirad en poste au CEPEC, prenne une part active aux travaux d'évaluation et d'analyse de QTL prévus (voir chapitre VI.1.a.).

Par ailleurs et pour information, le projet d'agro-foresterie, présenté par Raul Valle (CEPEC) et intitulé : "Multiple land use in agricultural properties utilizing agroforestry system for sustainable agriculture" a reçu un avis favorable de J. Vingerhoets.

#### VII.4. Autres projets

Il est également envisagé de préparer des projets sur un sujet précis, comme par exemple une étude génétique et génomique du système d'incompatibilité. Il s'agirait alors d'une étude plus personnelle, qui pourrait être financée par le CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) ou la FAPES-B.

### VIII. PROGRAMME HEVEA-MICROCYCLUS ET RELATION AVEC LE CEPEC

#### VIII.1. Contexte

La région de Bahia comporte de nombreuses plantations d'hévéas dont celle appartenant à Michelin. La société Michelin a notamment un important projet de replantation associant des cacaoyers aux clones hévéa résistants à *Microcyclus*. Un partenariat existe depuis plusieurs années déjà entre le programme hévéa du Cirad et Michelin, partenariat fondé sur la sélection de clones résistants à *Microcyclus ulei*. Le CEPEC a dans son programme de recherche une activité sur l'amélioration génétique de l'hévéa (se référer à l'organigramme plus haut). Au CEPEC, deux chercheurs sont impliqués sur hévéa : Adonias de Castro, gestionnaire de ce programme et agronome de formation, et Jose Raimundo Bonadie, responsable de la partie génétique et sélection.

Sur la base du partenariat Cirad-Michelin en cours, un nouveau partenariat sera mis en place à partir de novembre 2004 avec l'accueil de Dominique Garcia dans l'équipe de Julio Cascardo à UESC. D. Garcia doit travailler sur l'approche génomique de l'interaction hévéa/*Microcyclus ulei*, approche similaire à celle en cours sur cacao/*Crinipellis*. Un financement FAPES-B a été obtenu pour le démarrage de ce projet.



## VIII.2. La demande du CEPEC

Suite au meeting organisé par le Cirad et Michelin en avril 2004, Uilson Lopes Vanderlei souhaiterait appuyer les études de cartographie génétique et l'identification de QTL sur hévéa. Une discussion sur un projet de cartographie à partir de l'espèce *Pauciflora* a fait l'objet d'une discussion. Ce génotype présente une résistance à *Microcyclus* autre que celle apportée par les géniteurs utilisés par l'équipe du Cirad pour réaliser la carte génétique de l'hévéa. Bien qu'intéressé par la possibilité d'élargir mes connaissances sur hévéa, je pense qu'il n'est pas souhaitable, pour l'instant, de trop s'impliquer dans ce domaine et ce pour diverses raisons :

- L'activité sur cacao est très importante et un appui au programme hévéa ne peut être considéré qu'à la marge de mes activités sur cacao.
- Le chercheur CEPEC (J.R. Bonadie) est un personnage ambigu avec qui il ne sera pas simple de travailler. Avec Dominique Gracia, nous avons convenu d'adopter une attitude ouverte mais prudente. En d'autres termes, nous verrons ultérieurement avec Dominique et les autres collègues hévéa comment procéder avec le CEPEC. Par la suite et suivant l'évolution du partenariat, qui pourrait être étendu au CEPEC, il pourrait être envisagé, sur la base d'un projet scientifique clair et financé, que je puisse m'impliquer dans la cartographie de QTL chez l'hévéa.

## IX. CONCLUSION

Cette mission aura permis de me rendre compte plus précisément de l'environnement dans lequel je vais travailler à partir d'octobre 2004 et ce pour deux années. Je regrette toutefois ne pas avoir eu la possibilité de rentrer plus dans les détails notamment afin de mieux connaître les dispositifs expérimentaux et les croisements. Wilson Monteiro, responsable de l'amélioration génétique et de la sélection est une personne sympathique mais assez hermétique y compris avec ses collègues du CEPEC. Les contacts avec U. Lopes Vanderlei et J.L. Pires ont été, par contre, productifs. Cependant, du fait de leurs fonctions, leur disponibilité n'a pas permis d'avoir toujours des discussions approfondies. Les contacts avec Milton Makoto ont été très positifs et je pense que nous pourrions former une bonne équipe avec les étudiants et le personnel du laboratoire de Biologie moléculaire. Il y a également de bonnes relations avec l'équipe de phytopathologistes travaillant sur *Crinipellis perniciosus*, équipe dirigée par K. Gramacho (Phytopathologiste moléculaire). J'ai aussi pu constater une très nette amélioration des relations entre UESC et le

CEPEC, notamment au travers des échanges réguliers entre F. Micheli et A. Gestria pour UESC et K. Gramacho et J.L. Pires pour le CEPEC.

J'ai également eu l'occasion d'assurer une formation à des étudiants de UESC sur le logiciel de cartographie JoinMap. Cette intervention m'a été demandée par Dario Anhert, qui anime maintenant un enseignement en génétique avec d'autres collègues de l'Université. Mon positionnement dans le domaine de la formation sera par la suite affiné et validé par une demande d'habilitation qui doit être faite par le CEPEC auprès d'universités (UESC et Viçosa). Comme je l'ai déjà mentionné précédemment, il conviendra aussi de renforcer les échanges entre le laboratoire de biologie moléculaire de UESC (Fernanda Gaitto) et celui du CEPEC.

Avec cette nouvelle affectation dans le domaine de la recherche sur le cacaoyer au Brésil, le Cirad renforce son action dans ce pays. Le CEPEC est incontestablement le centre de recherche le mieux placé pour conduire des travaux en sélection assistée par marqueurs. Le CEPEC est aussi une base d'appui pour le Cirad qui lui permettrait d'intervenir au travers de différents projets avec d'autres pays producteurs d'Amérique du sud (Equateur, Vénézuëla, Costa-Rica, Pérou et Colombie). Ce positionnement peut permettre également d'établir un projet ambitieux de type CFC, dont l'objectif principal serait de créer un nouveau germplasm résistant durablement aux principales maladies qui sévissent en Amérique du Sud mais aussi en Afrique. Nos liens institutionnels et personnels avec, respectivement, les principaux pays producteurs africains et leurs chercheurs, pourraient permettre au Cirad de prendre part au rapprochement scientifique entre le CEPEC et les CNRA des autres pays producteurs.

Par ailleurs UESC et CEPEC, ont également des liens avec d'autres partenaires comme USDA/ARS, Masterfoods (Almirante cacao). Il est donc important qu'au travers des réseaux mis en place (Ingenic et son réseau génomique) et des projets, une cohérence soit maintenue tout en préservant les intérêts de chacune des équipes. Ceci concerne également les activités en génétique moléculaire et en génomique au Cirad, qui sont menées jusqu'à présent dans deux départements différents, ce qui peut parfois donner une image confuse de nos actions dans ce domaine vis-à-vis de nos partenaires.

Enfin, rappelons que cette implication du Cirad sur la recherche cacaoyère au Brésil touche certes à des domaines d'études très en amont mais dont la finalité s'inscrit bien dans la mission du Cirad qui est de contribuer au développement d'une agriculture durable.



## X. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Clément D, Lanaud C, Sabau X, Fouet O, Le Cunff L, Ruiz E, Risterucci AM, Glaszmann JC, Piffanelli P (2004). Creation of BAC genomic resources for cocoa (*Theobroma cacao* L.) for physical mapping of RGA containing BAC clones Theor. Appl. Genet 108 : 1627-1634
- Clément D., Risterucci A.M., Motamayor J.C., N'Goran J.K.A., Lanaud C. (2003a). Mapping QTL for yield components, vigor, and resistance to *Phytophthora palmivora* in *Theobroma cacao* L. *Genome*. vol.46 :n 2 : p. 204-212
- Clément D., Risterucci A.M., Motamayor J.C., N'Goran J.K.A., Lanaud C. (2003b). Mapping quantitative trait loci for bean traits and ovule number in *Theobroma cacao* L. *Genome*. vol.46 :n 1 : p. 103-111
- Crouzillat D, Phillips W, Fritz PJ, Pétiard V (2000). Quantitative trait loci analysis in *Theobroma cacao* L. using molecular markers. Inheritance of polygenic resistance to *Phytophthora palmivora* in two related cacao populations. *Euphytica* 114 :25-36
- Flament M.H., Kébé I., Clément D., Pieretti I., Risterucci A.M., N'Goran J.K.A., Cilas C., Despréaux D., Lanaud C. (2001). Genetic mapping of resistance factors to *Phytophthora palmivora* in cocoa. *Genome*. vol.44 :n 1 : p. 79-85
- Kuhn DN, Heath M, Wisser RJ, Meerow A, Brown JS, Lopes U, Schnell RJ (2003). Resistance genes homologues in *Theobroma cacao* as useful genetic markers. Theor. Appl. Genet 107 :192-202
- Lanaud C, Risterucci AM, Pieretti M, N'goran JAK and I, Fargeas (2004). Characterisation and genetic mapping of resistance gene analogue in cocoa (*Theobroma cacao* L.). *Mol Breed* 13 : 211-227
- Lande R, Thompson R (1990). Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* 124 :743-756
- Motamayor JC, Risterucci AM, Heath M, Lanaud C (2003). Cacao domestication II progenitor germplasm of Trinitario cacao cultivar. *Heridity* 9 : 322-330
- Quiroz VT, Guimarães CT, Auerth D, Shuster I, Daer RT, Peirera MG, Miranda VRM, Loguerio LL, Barros EG, Moriera MA (2003). Identification of a major QTL in cocoa (*Theobroma cacao* L.) associated with resistance to witches broom disease. *Plant Breed* 122 : 268-272
- Pugh T, Fouet O, Risterucci AM, Brottier P, Deletrez C, Courtois B, Clément D, Abouladze M, Larmande P, N'Goran JNK, Lanaud C. (2004). A new codominant markers-based cocoa linkage map : Development and integration of 201 new microsatellites markers. Theor. Appl. Genet 108 : 1151-1161
- Risterucci AM, Paulin D, Ducamp M, N'goran JAK, Lanaud C. (2003). Identification of QTLs related to cocoa resistance to three species of *Phytophthora* Theor. Appl. Genet 108 : 168-174

